

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)



EP 99/07296

REC'D 29 DEC 1999

WIPO

PCT

**Bescheinigung**

Herr Professor Dr. Jürgen Schrader in Düsseldorf/Deutschland hat eine  
Patentanmeldung unter der Bezeichnung

„Gewebebindende Peptide, ihre Identifizierung, Herstellung und  
Verwendung“

am 2. Oktober 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprüng-  
lichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole  
C 07 K, A 61 K und C 12 N der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 3. November 1999

**Deutsches Patent- und Markenamt**

**Der Präsident**

Im Auftrag

Hoiß



Aktenzeichen: 198 45 434.1

## 5 Gewebefestbindende Peptide, ihre Identifizierung, Herstellung und Verwendung

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf gewebebindende Peptide, ihre Identifizierung mit Hilfe von Geweben, ihre Herstellung und Verwendung als Arzneimittel oder Diagnostikum.

10

Die Pathogenese der Arteriosklerose wird zunehmend zunehmend auf eine Schädigung des Endothels, die in einer endothelialen Dysfunktion resultiert, zurückgeführt. Eine endotheliale Dysfunktion spiegelt sich vor allem in einem veränderten Expressionsmuster von Oberflächenproteinen (Selektinen, Adhäsionsmoleküle) aber auch in veränderten  
15 Syntheseraten von Wachstumshormonen wieder. So führt z. B. im frühen Stadium der Arteriosklerose eine erhöhte Expression der E- und P-Selektine und der zellulären Adhäsionsmoleküle VCAM und ICAM zur Einwanderung von Monocyten in die Gefäßwand. Die Umwandlung der Monocyten in Makrophagen führt zu einer veränderten Synthese von Wachstumsfaktoren, die insbesondere glatte Muskelzellen zur Proliferation und zur  
20 Freisetzung von Mediatoren, die inflammatorisch wirken, anregen.

Die medikamentöse Therapie der Arteriosklerose versucht die Ursachen frühzeitig, möglichst vor der Manifestation zu verringern. Ein Hauptziel ist dabei, durch eine Erhöhung der Ausscheidung der Cholesterinmetabolite (Gallensäuren) oder durch eine Verminderung der Cholesterinbiosynthese den erhöhten Plasmacholesterinspiegel zu reduzieren. Aufgrund der vom Organismus eingeleiteten Gegenregulation läßt sich mit einer medikamentösen Therapie der Gesamtcholesterinspiegel nur um ca. 30% senken. Da dieses Verfahren außerdem nicht geeignet ist, eine Regression einer bestehenden Arteriosklerose zu induzieren, ist die perkutane, transluminale Angioplastie (PTA), d. h. die Aufweitung des stenosierten  
30 Gefäßabschnittes mittels eines Ballonkatheters, heutzutage die Therapie der Wahl. Nachteil dieser Therapieform ist jedoch, daß es in 30-50% der behandelten Patienten zu einer Restenose, d. h. zu einem Wiederverschluß kommt. Alternativ erfolgt daher eine chirurgische Behandlung, indem ein Bypass gelegt wird. Aber auch bei dieser Therapie tritt bei ca. 50% der Patienten innerhalb von 3-6 Monaten nach der Behandlung eine Restenosierung des  
35 Bypass-Gefäßes auf.

5

10

30

Die Optimierung einer gewebespezifischen Expression ist insbesondere für die Therapie von vaskulären Erkrankungen von großer medizinischer Bedeutung. Dabei eröffnen sich nicht nur Möglichkeiten direkte Gefäßerkrankungen, wie z. B. Arteriosklerose und deren Folgeerkrankungen (Stenose, Restenose, Herzinfarkt) zu therapieren, sondern auch alle über die Blutbahn zu erreichenden Organe sowie Tumore. Letztendlich kann über einen gewebegerichteten Gentransfer in vaskuläre Zellen auch die Expression von therapeutischen Proteinen erfolgen, die aufgrund pathologischer oder genetischer Veränderungen im Zielorganismus nicht oder nicht mehr im ausreichenden Maße vorhanden sind, z. B. Faktor VIII-Mangel, Insulinmangel etc.

Ein wesentliches Ziel der somatischen Gentherapie ist es daher, ein therapeutisches Gen nach systemischer oder lokaler Administration so spezifisch wie möglich in die Zielzellen des Organismus einzuschleusen und das therapeutische Gen im wesentlichen nur in diesen Zellen zu exprimieren. Hierzu sollte das therapeutische Gen einerseits so verpackt sein, daß es beim Transport durch das Blutgefäßsystem durch Nukleasen im wesentlichen nicht abgebaut wird, und andererseits sollte es in eine Form vorliegen, die eine zellspezifische Genexpression in den Zielzellen ermöglicht. Das spezifische Erkennen von Zellen bezeichnet man auch als „Targeting“. Für dieses Targeting stehen grundsätzlich zwei Möglichkeiten zur Verfügung: zum einen kann man Antikörper gegen Rezeptoren an der Zelloberfläche verwenden, die in virale oder liposomale Vektorsysteme integriert sind (Vingerhoeds, H. et al (1994) supra; Wickham, T. J. (1996) supra), und zum anderen kann man Peptide mit hoher Bindungsaffinität für Rezeptoren auf der Zelloberfläche verwenden.

Mit bestimmten Antikörpern konnten beispielsweise bestimmte Tumorzellen erkannt und mittels einer geeigneten Markierung sogar im intakten Gewebeverband nachgewiesen werden. Ein wesentlicher Nachteil von Antikörpern ist jedoch, daß sie aus technischen Gründen meist in der Maus hergestellt werden und an Patienten oft zu schwerwiegenden Nebenwirkungen aufgrund einer Immunreaktion führen. Selbst sogenannte humanisierte Antikörper sind nicht frei von diesem Problem. In Einzelfällen kann es zu solch ausgeprägten Immunkomplexen kommen, die die Durchblutung der Niere drastisch einschränken und so zu einer tödlich verlaufenden Niereninsuffizienz führen.

Mit peptidpräsentierenden Banken konnten beispielsweise Interaktionen von Proteinen mit



anderen Makromolekülen wie Zuckern, Antikörper, Lipiden oder Proteinen in vitro studiert werden. Peptidpräsentierende Banken, die chemisch hergestellt werden, wurden z. B. von Geysen, H. M. et al. (1996) Mol. Immunol. 23, 709 oder de Koster, H. S. (1995) J. Immunol. Methods 187, 179-188 beschrieben. Bei der Peptidsynthese wurden an der

5 Festphase Aminosäuregemische verwendet, so daß die Aminosäurenabfolge der sich ergebenden Peptide statistisch, d. h. zufallsmäßig verteilt war. Die Peptidbanken konnten hierbei auch in Harz-gebundener Form verwendet werden (de Koster, H. S. et al. (1995) supra).

- 10 Mit der Verwendung von peptidpräsentierenden Banken, die beispielsweise auf der Präsentation der Peptide auf der Oberfläche von Phagen beruhen, wurde es möglich, eine Vielzahl verschiedener Peptide (bis zu ca.  $10^{11}$  Peptide) gleichzeitig zu präsentieren. Dabei werden die Peptide z. B. am N-Terminus des pIII Hüllproteins filamentöser Phagen präsentiert (siehe z. B. Kay, B. K. et al. (1993) Gene 128, 59 oder Jellis, C. L. et al. (1993)
- 15 Gene 137, 63-68). Die Länge der präsentierten Peptide variierten von 6 bis 38 Aminosäuren. Die Phagenbanken wurden unter anderem zum Epitopscreening von Antikörpern (Cortese, R. et al. (1994) Trends Biotechnol. 12, 262; Grihalde, N. D. et al. (1995) Gene 166, 187), zur Charakterisierung von protein- bzw. peptidbindenden Domänen (Adey, N. B. & Kay, B. K. (1996) Gene 169, 133; Blond-Elguindi, S. et al. (1993) Cell 75, 717-728; Balass, M. et al.
- 20 (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 10638-10642), zur Entdeckung von DNA-bindenden Motifen (Wang, B. et al. (1995) J. Biol. Chem. 270, 23239), zur Identifizierung von unbekannten Rezeptoren, die z. B. an virale Bindungsproteine binden (Hong, S. S. & Boulanger, P. (1995) EMBO J. 14, 4714), zur Identifizierung von proteinbindenden Peptiden (Daniels, D. A. & Lane, D. P. (1994) J. Mol. Biol. 243, 639-652; Hong, S. S. & Boulanger, P. (1995) EMBO J. 14, 4714-4727, No. 19) oder antigenbindenden Einzelketten-Fv(scFv)-
- 25 Fragmenten (Vaughan, T. J. et al. (1996) Nature Biotechnology 14, 309-314) verwendet und zum Targeting von Zellen (Barry, M. A. et al. (1996) Nature Medicine 2, 299-305, No. 3) vorgeschlagen.
- 30 Neben peptidpräsentierenden Phagenbanken sind peptidpräsentierende Bakterienbanken bekannt. Ein Beispiel hierzu sind Fusionen einer kombinatorischen Peptidbank mit Thioredoxin, was zur Identifizierung von Peptidaptameren führte, die die Cyclin-abhängige Kinase 2 erkennen (Colas, P. et al. (1996) Nature, 380, 548-550). Das Durchsuchen einer

kombinatorischen Peptidbank wurde z. B. auch mit Fusionen an den C-Terminus der alpha-Untereinheit von G<sub>i</sub> (340-350) zur Identifizierung von Rhodopsin-bindenden Sequenzen (Martin, E. L. et al. (1996) J. Biol. Chem. 271, 361-366, No. 1) durchgeführt. Ein anderes Beispiel sind Peptidinsertionen in einem Thioredoxin-Flagellin-Fusionsprotein, welches auf der E. coli Zelloberfläche präsentiert wird, womit Protein-Protein-Wechselwirkungen untersucht werden können (Lu, Z. et al. (1995) Bio/Technology 13, 366-372; U.S. Pat. No. 5,635,182).

Die oben beschriebenen Anwendungen der peptidpräsentierenden Banken beschränkten sich jedoch auf in vitro Untersuchungen mit isolierten und gereinigten Komponenten (Zucker, Proteine, Antikörper).

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher, ein Mittel zu finden, das eine gezielte und möglichst schonende Behandlung und Diagnose von erkrankten Organen ermöglicht.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein gewebebindendes Peptid ausgewählt aus einem Peptid mit der Aminosäuresequenz

GEGRTVVLSF, AWCRRGILGDAM, GNLVDLVVGFDD, RVSPPKKSGGGV, GSSKWGLTXKCG, RGGVRQSRGR, GEGRTVVCRS oder SQRWTALWQWIG sowie Varianten davon.

Unter Varianten versteht man gemäß der vorliegenden Erfindung Deletionen, Additionen oder Substitutionen von einer oder mehreren Aminosäuren, wobei die gewebespezifische Bindung des Peptids im wesentlichen nicht verändert wird, d. h. das Peptid hat nach wie vor seine Fähigkeit behalten, an ein bestimmtes Gewebe besser zu binden als an ein anderes.

Im Falle einer Deletion werden vorzugsweise nicht mehr als 4 Aminosäuren, vor allem nicht mehr als 2 Aminosäuren deletiert. Die Deletion erfolgt vorzugsweise am N- oder am C-Terminus des Peptids, insbesondere am N-Terminus.

Unter dem Begriff Addition versteht man gemäß der vorliegenden Erfindung nicht nur die Addition von einer oder mehreren Aminosäuren, beispielsweise von 1-25 Aminosäuren,

sondern auch Fusionsproteine von dem erfindungsgemäßen Peptid mit einem anderen C- und/oder N-terminalen Peptid oder Protein. Beispielsweise führt eine Fusion eines gewebespezifischen Peptids mit einem Peptid, das mehrere Histidine enthält, beispielsweise das Peptid GLFHAIAHFIHGGWHGLIHGWYG nicht nur zur einer gewebespezifischen

5 Bindung, sondern auch zu einer Permeabilisierung der Zellmembran bei leicht saurem pH (siehe z. B. Midoux, P. et al. (1998) Bioconjugate Chem. 9, 260-267). Besteht ein Fusionsprotein beispielsweise aus dem erfindungsgemäßen Peptid und mehreren Lysinen, beispielsweise 16 Lysinen in Abfolge oder dem Nucleocapsidprotein (NCp) 7 von HIV-1 oder NCp7-abgeleitete Peptide, so kann an das erfindungsgemäße Peptid besonders einfach eine Nukleinsäure, beispielsweise eine DNA enthaltend ein therapeutisches Gen, komplexiert werden (siehe z. B. Harbottle, R. P. et al. (1998) Human Gene Therapy 9, 1037-1047 oder Bachmann, A. S. et al. (1998) J. Mol. Med. 76, 126-132). Gemäß der vorliegenden Erfindung kann somit beispielsweise auch ein Fusionsprotein hergestellt werden, das ein gewebespezifisches Peptid, ein die Permeabilisierung der Zellmembran bewirkendes Peptid

15 und ein Nukleinsäure-bindendes Peptid enthält, was besonders vorteilhaft ist.

Im Falle von Substitutionen werden vorzugsweise konservative Substitutionen verstanden, d. h. Substitutionen, bei denen beispielsweise eine oder mehrere Aminosäuren mit einer hydrophoben Seitenkette durch eine oder mehrere andere Aminosäure mit einer anderen

20 hydrophoben Seitenkette ausgetauscht werden. Beispiele von Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten sind Glycin, Valin, Leucin, Isoleucin, Methionin, Phenylalanin, Tryptophan oder Prolin. Ebenso können Aminosäuren mit einem polaren neutralen Rest untereinander ausgetauscht werden. Beispiele hierzu sind Serin, Threonin, Cystein, Tyrosin, Asparagin oder Glutamin. Ferner können Aminosäuren mit einem polaren sauren Rest untereinander

25 ausgetauscht werden. Beispielsweise fallen hierunter Asparaginsäure oder Glutaminsäure. Auch können Aminosäuren mit einem polaren basischen Rest untereinander ausgetauscht werden, wie z. B. Lysin, Arginin oder Histidin. Vorzugsweise werden nicht mehr als bis zu 4 Aminosäuren, insbesondere nicht mehr als bis zu 2 Aminosäuren, vor allem nicht mehr als eine Aminosäure substituiert.

30 Unter dem Begriff Aminosäure versteht man gemäß der vorliegenden Erfindung nicht nur die in Proteinen natürlich vorkommenden Aminosäuren, sondern auch andere in eine Peptidkette einbaubaren Aminosäuren, wie z. B. Hydroxylysin, Hydroxyprolin, Ornithin, Citrullin oder

Homocystein.

Die einzelnen Aminosäuren des erfindungsgemäßen Peptids können auch modifiziert sein. Beispielsweise kann durch eine Modifizierung das Peptid markiert und/oder geschützt werden. Eine geeignete Markierung ist beispielsweise der Austausch der Hydroxylgruppe von Threonin oder Serin mit dem Isotop  $^{18}\text{F}$ , das eine Halbwertszeit von 2 Stunden besitzt, und daher gut im Klinikbetrieb verwendet werden kann. Alternativ kann das Peptid auch am Carboxyterminus über eine Fluorethylamidbindung mit  $^{18}\text{F}$  markiert werden. Die C-terminale Fluoramidierung erfolgt beispielsweise mit Fluorethylamin und einem Harnstoffderivat (z. B. TBU) zur Aktivierung.

Eine andere geeignete Markierung ist die Markierung von Cystein oder Methionin mit dem Schwefelisotop  $^{73}\text{S}$ . Das Isotop  $^{73}\text{S}$  hat gegenüber dem Isotop  $^{18}\text{F}$  den Vorteil, daß es eine längere Halbwertszeit besitzt.

Das erfindungsgemäße Peptid kann auch mit anderen Verbindungen markiert werden, beispielsweise mit  $\beta$ -Galaktosidase oder Biotin bzw. Avidin/Streptavidin. Eine radioaktive Markierung mit insbesondere kurzlebigen Isotopen hat jedoch den Vorteil, daß die Struktur des Peptids im wesentlichen unverändert bleibt und die Verteilung des Peptids im Organismus beispielsweise mit Hilfe der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) auf vorteilhafte Weise analysiert werden kann.

Für eine Markierung ist es im allgemeinen vorteilhaft, wenn die funktionellen Seitenketten der Aminosäuren vorher geschützt werden. Beispielsweise wird hierzu das Peptid an der Festphase mit Hilfe eines säurelabilen Harzes (z. B. SASRIN, ein 2-Methoxy-4-alkoxybenzylalkoholharz, Fréchet, J.M.J. et al. (1979) Polymer 20, 675) vom C- zum N-Terminus mittels der FastMoc®-Methode (Merrifield, R.B. (1963) J. Am. Chem. Soc. 95, 1328; Wang, S.S. (1973) J. Am. Chem. Soc. 95, 1328; Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA) synthetisiert. Auf diese Weise kann das Peptid vom Harz unter Bedingungen abgespalten werden, bei denen sowohl die Seitenkettenschutzgruppen als auch die N-terminale Schutzgruppe (Fmoc, N-Fluorenylmethoxycarbonyl) stabil bleiben. Anschließend kann die Markierung beispielsweise mit  $^{18}\text{F}$  erfolgen. Danach erfolgt im allgemeinen die Abspaltung der Schutzgruppen und die Reinigung über HPLC.



Ein anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Nukleinsäure kodierend für ein erfindungsgemäßes gewebebindendes Peptid. Besonders bevorzugt ist eine Nukleinsäure ausgewählt aus einer Nukleinsäure mit der Nukleotidsequenz

5

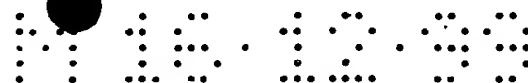
GGCGAGGGGGCGAACAGTCGTATTGTCGTTTCG,  
GCCTGGTGTCGGGGGGGTATCCTGGGCGACGCTATG,  
GGAAACCTGGTGGATCTAGTTGTGGGTTTTGACGAC,  
CGGGTGAGTCCGCCAAAGAAGTCGGGGGGCGGCGTG,  
10 GGGAGTAGCAAGTGGGGATTGACTTAAAAATGTGGG,  
CGCGGGGGAGTCCGCCAAAGAAGTCGGGGGGCGGCGT,  
GGCGAGGGGGCGAACAGTCGTATGTCGTTTCG oder  
TCCCAGAGGTGGACTGCACTCTGGCAATGGATCGGG  
sowie Varianten davon.

15

Unter dem Begriff Varianten versteht man gemäß der vorliegenden Erfindung insbesondere Varianten, die aufgrund der Degenerierung des genetischen Codes für dasselbe Peptid kodieren. Unter dem Begriff Varianten versteht man jedoch auch die zu den aufgeführten Desoxyribonukleinsäuren (DNA) korrespondierenden Ribonukleinsäuren (RNA). Auch kann  
20 die DNA bzw. RNA modifiziert sein, um z. B. besser gegenüber Nukleasenabbau geschützt zu sein. Geeignete Modifikationen finden sich z. B. bei Uhlmann, E. & Peyman A. (1990) Chemical Reviews 90, 543-584 No. 4.

25

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft einen Vektor enthaltend eine oder mehrere erfindungsgemäße Nukleinsäuren. Ein Vektor kann beispielsweise ein Expressionsvektor zur Herstellung der erfindungsgemäßen Peptide in prokaryotischen oder eukaryotischen Zellen sein. Beispiele für prokaryotische Expressionsvektoren sind für die Expression in E. coli z. B. die Vektoren pGEM oder pUC-Derivate und für eukaryotische Expressionsvektoren für die Expression in Saccharomyces cerevisiae z. B. die Vektoren  
30 p426Met25 oder p426GAL1, für die Expression in Insektenzellen z. B. Baculovirus-Vektoren wie in EP-B1-0 127 839 oder EP-B1-0 549 721 offenbart, und für die Expression in Säugerzellen z. B. die Vektoren Rc/CMV und Rc/RSV oder SV40-Vektoren, welche alle allgemein erhältlich sind.



Im allgemeinen enthalten die Expressionsvektoren auch für die jeweilige Wirtszelle geeignete Promotoren, wie z. B. den trp-Promotor für die Expression in *E. coli* (siehe z. B. EP-B1-0 154 133), den ADH2-Promotor für die Expression in Hefen (Russel et al. (1983), *J. Biol. Chem.* 258, 2674-2682), den Baculovirus-Polyhedrin-Promotor für die Expression in Insektenzellen (siehe z. B. EP-B1-0 127 839) oder den frühen SV40 Promotor oder LTR-Promotoren z. B. von MMTV (mouse mammary tumour virus; Lee et al. (1981) *Nature* 214, 228-232).

Beispiele von gentherapeutisch wirksamen Vektoren sind Virusvektoren, vorzugsweise Adenovirusvektoren, insbesondere replikationsdefiziente Adenovirusvektoren, oder Adeno-assoziierte Virusvektoren, z. B. ein Adenoassoziiierter Virusvektor, der ausschließlich aus zwei invertierten terminalen Wiederholungssequenzen (ITR) besteht.

Beispielsweise wird in adenoviralen Vektoren, insbesondere vom Typ 5 (Sequenz siehe Chroboczek, J. et al. (1992) *Virol.* 186, 280 - 285) und vor allem von der Untergruppe C, im allgemeinen die E1-Genregion durch ein Fremdgen mit eigenem Promotor bzw. durch die erfindungsgemäße Nukleinsäure ersetzt. Durch den Austausch der E1-Genregion, welche für die Expression der nachgeschalteten adenoviralen Gene Voraussetzung ist, entsteht ein nicht replikationsfähiges Adenovirus. Diese Viren können sich dann nur in einer Zelllinie vermehren, welche die fehlenden E1-Gene ersetzt.

Replikationsdefiziente Adenoviren werden daher im allgemeinen durch homologe Rekombination in der sogenannten 293-Zelllinie (humane embryonale Nierenzelllinie), die eine Kopie der E1-Region stabil im Genom integriert hat, gebildet. Hierzu werden unter Kontrolle eines geeigneten Promotors die erfindungsgemäße Nukleinsäure in rekombinante adenovirale Plasmide kloniert. Anschließend erfolgt die homologe Rekombination mit einem E1-defizienten adenoviralen Genom, wie z.B. d1327 oder del1324 (Adenovirus 5), in der Helferszelllinie 293. Bei erfolgreicher Rekombination werden virale Plaques geerntet. Die so erzeugten replikationsdefizienten Viren werden in hohen Titern (beispielsweise  $10^9$  bis  $10^{11}$  "plaque forming units" oder plaquebildenden Einheiten) zur Infektion der Zellkultur oder für die somatische Gentherapie eingesetzt.

Im allgemeinen ist die genaue Insertionsstelle der erfindungsgemäßen Nukleinsäure in das

adenovirale Genom nicht kritisch. Es ist z.B. auch möglich, die erfindungsgemäße Nukleinsäure an die Stelle des deletierten E3-Gens zu klonieren (Karlsson, S. et al. EMBO J. 5, 1986, 2377 - 2385). Vorzugsweise wird jedoch die E1-Region oder Teile davon, z.B. die E1A- oder E1B-Region (siehe z.B. WO 95/00655) durch die erfindungsgemäße Nukleinsäure ersetzt, vor allem, wenn auch die E3-Region deletiert ist. Desweiteren eignen sich adenovirale Vektoren der dritten Generation, d. h. Vektoren, die außer dem ITR und dem Verpackungssignal keine weiteren für virale Proteine kodierenden Sequenzen enthalten (Kochanek, S. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 5731). Die Rekombination in der Helferzelllinie erfolgt z. B. mit Hilfe eines Helferplasmids.

Die vorliegende Erfindung ist jedoch nicht auf das adenovirale Vektorsystem beschränkt, sondern auch Adeno-assoziierte Virusvektoren eignen sich in Kombination mit der erfindungsgemäßen Nukleinsäure in besonderer Weise, da der Transfer der erfindungsgemäßen Nukleinsäure in ruhende, differenzierte Zellen durch AAV erfolgen kann, was für die Behandlung von Gefäßerkrankungen besonders vorteilhaft ist. Für die Vektorfunktionen genügen im allgemeinen die beiden ca. 145 bp langen invertierten terminalen Wiederholungssequenzen (ITR: inverted terminal repeats; siehe z.B. WO 95/23867). Sie tragen die in "cis" notwendigen Signale für Replikation, Verpackung und Integration in das Wirtszellgenom. Durch die Integrationsfähigkeit kann eine lang anhaltende Genexpression in vivo gewährleistet werden, was wiederum besonders vorteilhaft ist. Ein weiterer Vorteil von AAV ist, daß das Virus nicht pathogen für den Menschen und relativ stabil in vivo ist. Die Klonierung der erfindungsgemäßen Nukleinsäure in den AAV-Vektor oder Teilen davon erfolgt nach dem Fachmann bekannten Methoden, wie sie z.B. in der WO 95/23867, bei Chiorini, J.A. et al. (1995), Human Gene Therapy 6, 1531 - 1541 oder Kotin, R.M. (1994), Human Gene Therapy 5, 793 - 801 beschrieben sind.

Gentherapeutisch wirksame Vektoren lassen sich auch dadurch erhalten, daß man die erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Liposomen (neutral oder kationisch) komplexiert, d.h. die Nukleinsäure ist im wesentlichen in das Liposom eingeschlossen, da damit eine sehr hohe Transfektionseffizienz, insbesondere von Herzmuskelzellen, erreicht werden kann (siehe z. B. WO95/27070) und die Nukleinsäure im wesentlichen vor DNasen geschützt ist. Besonders vorteilhaft ist die Transfektion mit Nukleinsäure-Liposomen-Komplexen mit Hilfe von Sendai



Viren in Form sogenannter HVJ-Liposomen (Virosomen), da hierdurch die Transfektionsrate noch weiter gesteigert werden kann.

Bei der Lipofektion werden kleine unilamellare Vesikel aus kationischen Lipiden durch  
5 Ultraschallbehandlung der Liposomensuspension hergestellt. Die Nukleinsäure wird ionisch  
auf der Oberfläche der Liposomen gebunden, und zwar in einem solchen Verhältnis, daß eine

positive Nettoladung verbleibt und die Nukleinsäure zu 100% von den Liposomen  
komplexiert wird. Neben den von Felgner et al. ( Felgner, P. L. et al. (1987) Proc. Natl.  
Acad. Sci. USA 84, 7413-7414) eingesetzten Lipidmischungen DOTMA (1,2-  
10 Dioleoyloxypropyl-3-trimethyl-ammoniumbromid) und DOPE (Dioloeylphosphatidy-  
lethanolamin) wurden inzwischen zahlreiche neue Lipidformulierungen synthetisiert und auf  
ihre Effizienz der Transfektion verschiedener Zelllinien getestet (Behr, J.P. et al. (1989),  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 6982 - 6986; Felgner, J.H. et al. (1994) J. Biol. Chem. 269,  
2550 - 2561; Gao, X. & Huang, L. (1991), Biochim. Biophys. Acta 1189, 195 - 203).

15 Beispiele der neuen Lipidformulierungen sind DOTAP N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-  
N,N,N-trimethylammoniummethylsulfat oder DOGS (TRANSFECTAM; Dioc-  
tadecylamidoglycylspermin). Ein Beispiel für die Herstellung von DNA-Liposomenkom-  
plexen aus Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin und Cholesterin und deren erfolgreiche  
Anwendung in der Transfektion von Gefäßwänden mit Hilfe von Sendai-Viren ist in der  
20 WO95/27070 beschrieben.

Besonders vorteilhaft ist es, wenn der Nukleinsäure-Liposomenkomplex Nukleinsäure-  
Bindeproteine, beispielsweise chromosomale Proteine, vorzugsweise HMG-Proteine (High  
Mobility Group Proteine), insbesondere HMG-1 oder HMG-2, oder nukleosomale Histone  
25 wie H2A, H2B, H3 oder H4 enthält, da hierdurch die Expression der gewünschten  
Nukleinsäure mindestens 3-10fach gesteigert werden kann. Die chromosomalen Proteine  
können beispielsweise aus Kalbsthymus oder Rattenleber nach allgemein bekannten Verfahren  
isoliert oder gentechnisch hergestellt werden. Humanes HMB-1 kann beispielsweise nach  
dem Fachmann bekannten Methoden besonders einfach gentechnisch unter Verwendung der  
30 humanen cDNA-Sequenz aus Wen, L. et al. (1989) Nucleic Acids Res., 17(3), 1197-1214,  
hergestellt werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher auch ein Verfahren zur

Herstellung eines erfindungsgemäßen Peptids, bei dem das Peptid entweder chemisch synthetisiert oder, wie oben bereits erläutert, gentechnisch hergestellt wird. Die chemische Synthese erfolgt beispielsweise mit Hilfe der allgemein bekannten Merrifield-Technik.

- 5 Gewebebindende Peptide können jedoch auch gemäß der vorliegenden Erfindung dadurch gewonnen werden, daß ein oder mehrere Peptide mit einem Gewebe in Kontakt gebracht und anschließend das bzw. die gebundenen Peptide isoliert werden.

10 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Verfahren zum Auffinden eines gewebebindenden Peptids enthaltend folgende Schritte:

- (a) In-Kontakt-bringen eines Gewebes mit einem oder mehreren Peptiden, und
- (b) Isolieren eines oder mehrerer gewebebindender Peptide.

- 15 Vorzugsweise werden nach dem In-Kontakt-bringen eines Gewebes mit einem oder mehreren Peptiden gemäß Schritt (a) nicht-gebundene Peptide beispielsweise durch Waschen des Gewebes mit einer geeigneten Pufferlösung entfernt.

- 20 Unter Peptid versteht man gemäß der vorliegenden Erfindung vorzugsweise Peptide mit einer Länge von ca. 5 bis ca. 40 Aminosäuren, insbesondere mit einer Länge von ca. 5 bis ca. 20 Aminosäuren, vor allem mit einer Länge von ca. 10 bis ca. 20, besonders bevorzugt mit einer Länge von ca. 10 bis ca. 15 Aminosäuren.

- 25 Unter Gewebe versteht man gemäß der vorliegenden Erfindung Zellverbände, insbesondere Zellverbände einschließlich ihrer Interzellulärsubstanz, beispielsweise Epithelgewebe, Bindegewebe, Stützgewebe, Muskelgewebe oder Nervengewebe. Der Begriff Gewebe schließt gemäß der vorliegenden Erfindung auch ganze Organe oder Teile davon sowie Gefäße ein. Vorzugsweise handelt es sich bei den Organen bzw. Gefäßen noch um „lebende“ Organe bzw. Gefäße.

30

Die Interzellulärsubstanz ist eine in die Zwischenzellräume eingelagerte Substanz, die eine strukturlos erscheinende Grundsubstanz und faserige Bindegewebsfasern enthält. Es war daher völlig überraschend, daß durch In-Kontakt-bringen von Gewebe mit einem oder

mehreren Peptiden gewebebindende Peptide aufgefunden wurden, die im wesentlichen für das verwendete Gewebe spezifisch waren und nicht vorwiegend an unspezifische Strukturen, wie z. B. die Interzellulärsubstanz, gebunden wurden.

- 5 Die Spezifität der gewebebindenden Peptide läßt sich vorzugsweise dadurch erhöhen, daß die gemäß Schritt (b) isolierten Peptide wiederholt ein oder mehrmals mit dem Gewebe in Kontakt gebracht werden. Vorzugsweise werden die Peptide nach ihrer jeweiligen Isolierung bis zu 10mal mit dem entsprechenden Gewebe in Kontakt gebracht. Auf diese Weise können auch kreuzspezifische Peptide, die für mehrere Gewebearten spezifisch sind, gefunden werden, wenn die Peptide nacheinander mit verschiedenen Geweben in Kontakt gebracht werden. Werden beispielsweise die Peptide portionsweise sowohl mit gesundem als auch mit krankem Gewebe in Kontakt gebracht, so können durch einen subtraktiven Vergleich die Peptide aufgefunden werden, die für gesundes bzw. krankes Gewebe spezifisch sind. Peptide, die im wesentlichen nur für krankes Gewebe spezifisch sind, eignen sich beispielsweise besonders vorteilhaft für die Diagnose, beispielsweise im Rahmen einer PET-Untersuchung.

- Es ist auch bekannt, daß durch äußere Umstände, wie z. B. Stress oder Entzündungen, Gewebe pathologisch verändert werden können. So verändern z.B. glatte Muskelzellen in restenotischen Gefäßarealen ihren gesamten Phänotyp und gehen vom ruhenden, sekretorischen in den proliferativen Phänotyp über. Mit Hilfe der vorliegenden Erfindung können folglich auch gewebebindende Peptide gefunden werden, die unter in vivo Bedingungen spezifisch pathologisch verändertes Gewebe erkennen können. Auch ist es auf vorteilhafte Weise möglich, pathologische Zelltypen im Gewebeverband, die bisher noch nicht ausreichend charakterisiert werden konnten, spezifisch durch Verwendung der gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren selektierten Peptiden zu charakterisieren, zu identifizieren und beispielsweise gentherapeutisch zu therapieren.

- Zum Auffinden gewebebindender Peptide gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es vorteilhaft, wenn eine Peptidbank, beispielsweise eine kombinatorische Peptidbank (siehe z. B. Colas, P. et al. (1996) supra), verwendet wird. Unter Peptidbank gemäß der vorliegenden Erfindung versteht man eine Ansammlung von mehreren verschiedenen Peptiden, die frei oder in gebundener Form vorhanden sind.

Eine Peptidbank aus freien Peptiden enthält beispielsweise eine Ansammlung von chemisch synthetisierten Peptiden. (siehe z. B. Geysen, H. M. et al. (1996) supra). Bei der Peptidsynthese wurden an der Festphase Aminosäuregemische verwendet, so daß die Aminosäurenabfolge der sich ergebenden Peptide statistisch verteilt war. Die Peptidbanken konnten hierbei auch in Harz-gebundener Form verwendet werden (de Koster, H. S. et al. (1995) supra).

Peptide in gebundener Form sind beispielsweise auch sogenannte peptidpräsentierende Banken, z. B. eine peptidpräsentierende Phagenbank oder vorzugsweise eine peptidpräsentierende Bakterienbank, wie oben bereits näher beschrieben. Bei den peptidpräsentierenden Banken werden die Peptide in Form eines Fusionsproteins an der Oberfläche von beispielsweise Phagen oder Bakterien präsentiert. Bevorzugte Fusionen sind Insertionen, vorzugsweise Fusionen mit Thioredoxin, mit Thioredoxin(TrxA)-Flagellin(FliC), mit der alpha-Untereinheit von  $G_i$ , wie oben bereits näher beschrieben, oder z. B. mit LamB (Charbit, A. et al. (1988) Gene 70, 181-189) oder Lpp-OmpA (Francisco, J. A. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 10444-10448).

Für die vorliegende Erfindung sind peptidpräsentierende Bakterienbanken und insbesondere solche mit einem Thioredoxin-Fusionsprotein vor allem für eine Selektion in einem in vivo angenäherten Perfusionsmodell von isolierten Gefäßen und Organen aus folgenden Gründen besonders bevorzugt:

1. Die Peptide werden als Fusionsproteine zusammen mit einem Protein, beispielsweise Thioredoxin, präsentiert, dessen dreidimensionale Struktur im allgemeinen bekannt ist. Die randomisierten Peptide werden im allgemeinen in einer sehr gut zugänglichen, auf der Oberfläche des Gesamtproteins nach außen liegenden Domäne, beispielsweise der sogenannten „Cys-Cys active site loop“ des Thioredoxins, präsentiert. Dadurch daß das Peptid im allgemeinen genügend weit vom Bakterium und somit gut zugänglich präsentiert wird, wird im allgemeinen eine gute Interaktion mit dem gewünschten Bindungspartner ermöglicht.

Folglich kann im allgemeinen gewährleistet werden, daß beispielsweise beim viralen Gentransfer in vaskuläre Zellen die Peptide auch in Form von Fusionsproteinen mit einem

therapeutisch wirkenden Protein ihre Wirkung entfalten können, ohne daß sie ihre Bindungsfähigkeit im wesentlichen verlieren. Peptide die an den Terminus eines Proteins fusioniert und auf diese Weise in Phagenbanken präsentiert werden, verlieren im allgemeinen ihre Bindungsfähigkeit sobald sie als Fusionsproteine zusammen mit einem therapeutisch wirkenden Protein exprimiert werden, was für die Verwendung in der Genterapie nachteilig ist. Ein wesentlicher Grund hierfür ist, daß die Peptide während der Präsentation selbst einen freien N-oder C-Terminus aufweisen, der für eine Bindung zur Verfügung steht. Aus diesem Grund ist es besonders vorteilhaft, wenn die Peptide in Form von Insertionen in ausgewählte Oberflächenproteine von einer peptidpräsentierenden Bank präsentiert werden.

2. Beispielsweise ist das E.coli Thioredoxin stabil gegen Proteasen. Folglich ist ein proteaseresistentes Protein in Form eines Fusionsproteins mit dem Peptid beispielsweise für eine Selektion im ex-vivo perfundierten Organmodell besonders bevorzugt, insbesondere da Proteasen sich in den Gefäßen an den Zellen befinden können. Vor allem Organe, z.B. isolierte perfundierte Leber, aber auch Tumore, setzen eine hohes Maß an Proteasen frei, die das Fusionsprotein im Falle einer Proteaseempfindlichkeit spalten könnten.

3. Bakterien können aufgrund ihrer Größe nicht so schnell wie Phagen in den extravasalen Raum gelangen und damit beispielsweise im perfundierten Organ an Zellen gelangen, die für eine spätere Therapie nicht zugänglich sind. Im Gegensatz zu Phagen können entsprechende Bakterienbanken auch bei Körpertemperatur inkubiert werden, ohne daß die Ergebnisse durch Endozytose im wesentlichen verfälscht werden. Hierdurch können die in vivo Bedingungen auch ex vivo im wesentlichen eingehalten werden, was beispielsweise bei „lebenden“ Organen bzw. Gefäßen besonders vorteilhaft ist.

Unter dem Begriff „lebend“ versteht man gemäß der vorliegenden Erfindung Organe bzw. Gefäße, die noch funktionsfähig sind. Für den Erhalt der Funktionsfähigkeit über einen längeren Zeitraum ist es daher vorteilhaft, wenn das Organ bzw. das Gefäß ausreichend mit Sauerstoff und Nährsubstraten versorgt werden. Hierzu eignet sich vorzugsweise eine Nährlösung, die  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  sowie ein Protein, beispielsweise ein Albumin wie BSA (bovines Serumalbumin) enthält. Vorzugsweise sind die Konzentration an Calciumionen 2,5 mM und an Magnesiumionen 1,1 mM. Albumin ist vorzugsweise in einer Konzentration



von 1% in der Nährlösung vorhanden. Zur Perfusion von isolierten Gefäßen und isolierten Organen eignet sich besonders die sogenannte Krebs-Henseleit-Lösung, die wie folgt zusammengesetzt ist (Angaben in mM): NaCl 116; KCl 4,6; MgSO<sub>4</sub> 1,1; NaHCO<sub>3</sub> 24,9; CaCl<sub>2</sub> 2,5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2; Glukose 8,3; Pyruvat 2,0 sowie 1% BSA äquilibriert mit 95% O<sub>2</sub> und 6% CO<sub>2</sub> (pH 7,4; 37 °) (siehe z. B. Decking , U. K. M. et al. (1997) Circulation Research 81, 154-164, No. 2)

In einer bevorzugten Ausführungsform wurde beispielsweise eine peptidpräsentierende Bakterienbank in einem in-vitro Gefäßperfuisionsmodell eingesetzt, nachdem zuvor in-vivo am Gesamttier (Ratte) an einem Gefäß eine Restenose durch Denudierung des Endothels mittels eines Ballonkatheters induziert worden war. Dieses Verfahren hat die entscheidenden Vorteile, daß die als Folge pathologischer Gefäßprozesse auftretenden Veränderungen der Expressionsmuster von membranassozierten bzw. membrangebundenen Proteinen erhalten bleiben, die Zellpolarität sich nicht verändert und alle Zellen in ihrem natürlichen Gewebeverband verbleiben.

Die mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens aufgefundenen Peptide können, wie oben bereits näher beschrieben, modifiziert werden. Eine geeignete Modifikation ist beispielsweise eine radioaktive oder nicht-radioaktive Markierung für die Verwendung in einem Testsystem bzw. Diagnostikum.

Für die gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren auffindbaren gewebespezifischen Peptide gibt es zahlreiche Anwendungen, beispielsweise den gewebespezifischen Transfer von Substanzen, insbesondere von pharmazeutisch aktiven Verbindungen, vor allem für den gewebespezifischen Gentransfer. Der gewebespezifische Gentransfer dient beispielsweise zur Diagnose und/oder Therapie von Gefäß- und/oder Organerkrankungen mit Hilfe beispielsweise viraler und/oder nicht-viraler Vektoren, vorzugsweise mit Hilfe von Liposomen, wie oben bereits näher beschrieben.

Für den gewebespezifischen Gentransfer kann das Peptid physikalisch, chemisch oder gentechnisch an die gewünschte Nukleinsäure gekoppelt werden (s. o.). Beispielsweise kann das Peptid entweder zusammen mit einem therapeutischen Protein, z. B. Stickstoffmonoxid-Synthase (siehe z. B. WO95/27020), Insulin (siehe z. B. EP-B1-0 001 929), Erythropoietin



(siehe z. B. EP-B1-0 148 605), oder Blutgerinnungsfaktoren, wie z. B. Faktor VIII, Interferone, Cytokine, Hormone, Wachstumsfaktoren usw. exprimiert werden, oder an eine Nukleinsäure, welche ein therapeutisches Gen, beispielsweise ein Gen kodierend für die beispielhaft genannten therapeutischen Proteine oder für eine antisense-Nukleinsäure zum gezielten Ausschalten von Expressionsprodukten, gekoppelt werden. Geeignete Kopplungsmethoden sind z. B. über Lysinreste oder Nucleocapsidproteine, wie oben bereits

näher erläutert (siehe z. B. Harbottle, R. P. et al. (1998) supra oder Bachmann, A. S. et al. (1998) supra). Besonders vorteilhaft ist es, wenn ein oder mehrere gewebebindende Peptide über eine positiv geladene Domäne, z. B. Polylysin, an eine oder mehrere Nukleinsäuren gebunden sind.

Zur Erhöhung der Membranpermeation beim Gentransfer eignet sich auch ein Peptid, das die Membranpermeation erhöht, z. B. ein Histidin-enthaltendes Polypeptid (s.o.). Vorzugsweise wird eine sogenannte Polyfunktionslösung enthaltend eine Nukleinsäure mit dem gewünschten therapeutischen Gen, ein Fusionsprotein aus gewebespezifischem Peptid und einem DNA-bindenden Anteil, z. B. eine positiv geladenen Domäne, und einem Peptid, das die Membranpermeation erhöht, eingesetzt. Eine geeignete Polyfunktionslösung ist beispielsweise bei Midoux, P. (1998) supra, beschrieben. Desweiteren ist eine Kopplung des Peptids an die Liposomen über ein beispielsweise eingebrachtes C-terminales Cystein an eine aktivierte Lipidkomponente, z. B. über MPB-PE, Maleinimidophenylbutyrylphosphatidylethanolamin, (Zuidam, N.J. et al. (1995) Biochim. Biophys. Acta 1240, 101).

Die erfindungsgemäßen Peptide können auch zur Änderung des Tropismus von Viren, vorzugsweise von Adenoviren, beispielsweise für den gewebespezifischen Gentransfer, eingesetzt werden. Dies erfolgt beispielsweise durch Anheften des Peptids über einen geeigneten Linker an den C-Terminus der Knob-Domäne (siehe z. B. Douglas, J. T. & Curiel, D. T. (1997) Neuromuscular Disorders 7, 284-298) oder durch den Austausch der für die Bindung verantwortlichen Region in der Knob-Domäne des Fiberproteins. Alternativ kann auch das RGD-Motiv in der hypervariablen Region der Penton-Base (z.B. Ad12 19AS, Ad2,5 82 AS) durch ein zellspezifische Peptid ersetzt werden analog zu den von Wickham durchgeführten Versuchen mit dem FLAG-Epitop, wobei vorzugsweise ebenfalls der natürliche Tropismus ausgeschaltet werden kann (siehe Wickham et al. (1996) J. Virol. 70, 6831). Die Änderung des Tropismus kann beispielsweise über ein

Shuttleplasmid erfolgen, das für das entsprechende Konstrukt kodiert.

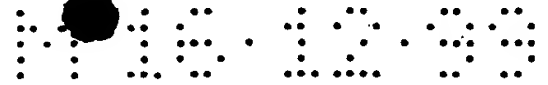
Eine andere Verwendungsmöglichkeit der gewebebindenden Peptide ist die Verwendung zur Diagnose von krankhaft verändertem Gewebe, vor allem in einem pathologisch veränderten Gefäß, bei Entzündungen, Arteriosklerose, Gefäßen, die Tumorgewebe versorgen, und Gewebe mit proliferierenden glatten Muskelzellen des Gefäßsystems, sowie die Darstellung verschiedener Abschnitte des Gefäßsystems, wie z. B. kleine/große Gefäße, Venen, organspezifisches Endothel.

- 10 Die Diagnose kann hierbei entweder indirekt über z. B. Peptid-erkennende Antikörper beispielsweise in einem allgemein bekannten ELISA-Test erfolgen (siehe z. B. Voller, A. et al. (1976) Bull. World Health Organ., 53, 55-63) oder direkt, indem das gewebebindende Peptid zusätzlich markiert ist. Die Markierung kann hierbei eine nicht-radioaktive Markierung, z. B. über Biotin bzw. Avidin/Streptavidin, sein oder auch eine radioaktive Markierung (s. o.).

- 20 Eine radioaktive Markierung ist insbesondere bei einer Ganzkörperuntersuchung des Patienten mit bildgebenden Verfahren, wie z. B. PET (positron emission tomography) oder SPECT (single photon emission computer tomography) zur Diagnose von beispielsweise Entzündungen, Gefäßveränderungen oder Tumoren, vorteilhaft. Hierzu wird dem Patienten das markierte Peptid intravenös appliziert und die Verteilung des Peptids im Organismus beispielsweise mittels „Ganzkörper-PET“ analysiert.

- 25 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Arzneimittel und/oder Testsystem beispielsweise in Form eines Diagnostikums enthaltend ein oder mehrere erfindungsgemäße Peptide bzw. ein oder mehrere Peptide, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren aufgefunden wurden, oder ein oder mehrere erfindungsgemäße Nukleinsäuren, und gegebenenfalls geeignete Hilfs- und/oder Zusatzstoffe.

- 30 Ein anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung bezieht sich auch auf eine Zusammensetzung beispielsweise in Form eines Transfektions- oder Polyfektionssystems enthaltend ein oder mehrere erfindungsgemäße Peptide bzw. ein oder mehrere Peptide, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren aufgefunden wurden, oder ein oder mehrere



erfindungsgemäße Nukleinsäuren und eine weitere Substanz, vorzugsweise eine pharmazeutisch aktive Verbindung, wie oben bereits näher beschrieben, und gegebenenfalls geeignete Hilfs- und/oder Zusatzstoffe.

- 5 Als Hilfs- und/oder Zusatzstoffe eignen sich beispielsweise allgemein bekannte Protease- bzw. Nukleaseinhibitoren.
- 

Die folgenden Figuren, Tabellen und Beispiele sollen die Erfindung näher beschreiben, ohne sie zu beschränken:

10

#### FIGUREN UND TABELLEN

15

Fig.1 zeigt das Carotismodell von Clowes. Nach Ligaturen der A. Carotis interna und externa wird ein Ballonkatheter über die A. Carotis externa in die A.carotis communis eingeführt, dilatiert und das Gefäß über eine Strecke von 1 – 1,5 cm denudiert. Anschließend wird der Katheter wieder entfernt, die A. Carotis externa ligiert und die A. Carotis interna wiedereröffnet.

20

Fig. 2 zeigt die Selektion der Peptide in der ex-vivo perfundierten Rattencarotis.

25

Fig. 3 zeigt die relative Bindungsstärke des Peptids P36 an eine dilatierte Rattencarotis, die am 8. postoperativen Tag entnommen wurde, im Vergleich zur unbehandelten Kontroll-Carotis.

30

Fig. 4 zeigt die Bindungskonstanten des Peptids P36 an primäre, aortale Schweine-endothelzellen (PAEC), primäre Schweine glatte Muskelzellen (VSMC) und Affennierenzellen (COS). Die Stimulation der Endothelzellen erfolgte durch LPS und  $\text{TNF}\alpha$  (PAEC stimuliert).

Tab. 1 zeigt die DNA-Sequenzen und davon abgeleitete Peptidsequenzen der isolierten Klone.

ABKÜRZUNGEN

	BSA	bovines Serumalbumin
	DCM	Dichlormethan, synonym: Methylenchlorid
5	DIEA	Diisoethylamin
	EDT	Ethandithiol
	HBTU/HOBt	Hydroxybenzotriazol
	IMC	Medium, enthält (1xM9 Salze, 0,2% (Casaminosäuren, 0,5 % Glucose, 1 mM MgCl <sub>2</sub> ) 10xM9 Salze: 0,42 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,22 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 85 mM NaCl, 187 mM NH <sub>4</sub> Cl, pH7,4)
10	NMP	N-Methyl-2-pyrrolidon
	PBS	Phosphatpuffer
	SASRIN	„super acid sensitive resin“
	TFA	Trifluoressigsäure

BEISPIELE

## 1. Herstellen einer peptidpräsentierenden Bakterienbank

- 20 Es wurde eine peptidpräsentierende Bakterienbank verwendet, die über die Firma Invitrogen BV, Niederlande kommerziell erhältlich ist (FliTrx™ Random Peptide Display Library, Katalog No. K1125-01; Z. Lu, et al. (1995) Biotech. 13, 366). Bei dieser Bakterienbank enthalten die Bakterien eine Expressionskassette, die für ein Fusionsprotein aus Flagellin und Thioredoxin codiert. Das Flagellin dient zur Verankerung des
- 25 Fusionsproteins in der Bakterienmembran, während das Thioredoxin in einer exponierten Domäne ein fremdes 12 Aminosäuren langes Peptid präsentiert, dessen codierendes 36 Basenpaar langes Oligonukleotid an der entsprechenden Stelle in die codierenden Sequenz des Thioredoxins kloniert wurde. Das zur Klonierung verwendete Oligonukleotid wurde nach dem Zufallsprinzip synthetisiert, so daß die Bakterienbank insgesamt 10<sup>9</sup> verschiedene
- 30 Peptide repräsentiert. Die Expressionskassette befindet sich unter der Kontrolle des Tryptophan-Promoters, so daß die Expression des Fusionsproteins zum Zeitpunkt einer exponentiell wachsenden Bakterienkultur durch die Gabe von Tryptophan angeschaltet werden kann. Da jedes Bakterium nur ein Plasmid aufnimmt, wird von jedem Bakterium nur eine Sorte Peptid mit definierter Aminosäure-Sequenz exprimiert und auf der
- 35 Oberfläche präsentiert.

## 2. Anzüchten der Bakterienkultur

50 ml IMC Medium wurden mit  $10^9$  Bakterien versetzt und über Nacht 15 Stunden bei  $+25^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurde die Zellzahl durch Messung der  $\text{OD}_{600}$  bestimmt,  $10^{10}$

- 5 Zellen in 50 ml IMC Medium mit  $100\mu\text{g/ml}$  Ampicillin inkubiert und die Expression der Bakterienbank durch Zugabe von  $100\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Tryptophan induziert. Die Zellen wurden weitere 6 Stunden bei  $25^\circ\text{C}$  inkubiert, bevor sie zur Selektionierung verwendet wurden.

## 10 3. In vitro Gefäßperforationsmodell

Die Induktion einer Restenose erfolgte in einem etablierten Restenosemodell in der Ratte (siehe z. B. Clowes, A. W. et al. (1983) Lab. Invest. 49, 327).

- 15 Wie in Fig. 1 dargestellt, wurde beispielsweise in einer narkotisierten Ratte die Arteria carotis communis durch Einführung eines Ballonkatheters von den Endothelzellen befreit (Denudation). Durch diesen Eingriff werden die glatten Gefäßmuskelzellen zur Proliferation angeregt und ändern ihren Phänotyp vom ruhenden, sekretorischen glatten Muskelzelle zur proliferierenden glatten Muskelzelle.

20

Am Tage der stärksten Proliferation der glatten Muskelzellen (10. postoperativer Tag) wurde das in Fig. 1 gekennzeichnete Gefäßsegment herauspräpariert und in einem speziellen ex-vivo Perfusionssystem mit einem salinen Medium unter Zusatz von Glucose und Sauerstoffbegasung perfundiert. Nach einer Äquilibrationszeit von 10 min, die zum

- 25 Auswaschen jeglicher Blutzellen und Blutbestandteile diente, wurde dieses Gefäßsegment mit insgesamt  $10^{10}$  peptidpräsentierenden Bakterien in sauerstoffbegastem salinen Medium mit einem Flow von  $0,2\text{ ml/min}$ . 60 min rezirkulierend perfundiert. Die nicht bindenden Bakterien wurden durch Behandlung mit salinem Medium abgelöst und die spezifisch bindenden Bakterien durch zehnminütige Perfusion unter stringenten Bedingungen mit  $0,1\text{ M}$  Glycin pH 2,0 eluiert. Die eluierten Bakterien wurden erneut kultiviert und zur Erhöhung der Spezifität weiteren fünf Selektionszyklen (siehe Fig. 2) unterworfen.
- 30

#### 4. Versuchsprotokoll für die perfundierten Ratten-Carotis

Ca 500g schwere Ratten wurden durch Gabe von 100 $\mu$ l/100 g Körpergewicht Dormicum und 100  $\mu$ l/100g Körpergewicht Hypnorm narkotisiert. Anschließend wurde die Arteria Carotis kranial der Bifurkation freipräpariert, die A. Carotis interna sowie alle davon abzweigenden Abgänge ligiert und ausgehend von der Carotis externa ca 2 cm entlang der Carotis Communis mit einem 2F Ballonkatheter bei 1 bar die Carotis Communis denudiert. Die Ligatur der A. Carotis interna wurde postoperativ wieder eröffnet. Am 10. postoperativen Tag wurde die denudierte A. Carotis communis freipräpariert und ex vivo mit 0,1 ml/min PBS mit 0,1 M Glucose perfundiert. Währenddessen wurden 10 ml der mit Tryptophan induzierten Bakteriensuspension bei 1000 rpm 3 min abzentrifugiert, in PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und das Sediment in 6 ml Gesamtvolumen PBS, 0,1 M Glucose, 0,1% BSA, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub> suspendiert. Die Carotis wurde anschließend rezirkulierend mit dieser Suspension unter Sauerstoffbegasung 1 h mit 0,2 ml/min perfundiert. Anschließend wurde die Suspension durch Perfusion mit 2-3 ml PBS bei 0,2 ml/min ausgewaschen, bevor die gebundenen Bakterien durch Elution mit 3 ml 0,1 M HCl (pH 2,2 mit Glycin eingestellt) eluiert und in 50 ml IMC Medium, 100  $\mu$ g/ml Ampicillin über Nacht bei +25 °C vermehrt wurden.

#### 5. Ergebnis der Selektionsversuche

Gemäß den oben beschriebenen Versuchen wurden Bakterien erhalten, die auf ihrer Oberfläche Peptide exprimieren, die spezifisch an proliferierende glatte Muskelzellen binden. Die nach sechs Selektionen erhaltenen Bakterien wurden anschließend auf Nährmedium ausplattiert und ausgehend von 60 Einzelkolonien wurden Kulturen angezüchtet. Von diesen kultivierten Bakterien, wurde die Plasmid-DNA isoliert und sequenziert. Mit diesem Modell konnten überraschenderweise spezifisch bindenden Peptide mit einer der in vivo Situation am nächsten stehende Methode (Organkulturmodell) detektiert werden.

Nach Sequenzierung der DNA der isolierten Bakterien wurden die DNA-Sequenzen und davon abgeleitete Peptidsequenzen erhalten (siehe Tabelle 1). Das Peptid 36 zeigt in seiner Sequenz Homologien zum  $\alpha_4$ -Integrin, das auf Leukocyten exprimiert wird und für die

Anheftung der Leukocyten an aktiviert vaskuläre Zellen verantwortlich ist. Die Erkennung wird dabei durch das vaskuläre zelluläre Adäsionsmolekül VCAM-1 mediert. Die Homologie liegt nicht in dem Bereich, der als bindender Bereich des Integrins (RGD-Motif) charakterisiert ist.

5

## 6. Bindungsstudien

Das für die Bindungsstudien eingesetzte Peptid aus Klon 36 (Peptid 36) wurden mit der Fast-Moc Festphasensynthese an einem vollautomatischen Peptidsynthesizer der Firma Applied Biosystems im 0.1 mmol Maßstab hergestellt. Zur Bestimmung der Bindungsaffinitäten an den gewünschten Zelltyp wurde das Peptid radioaktiv markiert.

## 7. Radioaktive Markierung eines gewebespezifischen Peptids

Da die zur Selektion eingesetzten Bakterien die Peptide auf ihrer Oberfläche im Kontext eines Fusionsproteins (Thioredoxin) präsentierten, wurde die N-terminal auftretende Aminosäure (Glycin) für die radioaktive Markierung verwendet. Dazu wurde  $^{14}\text{C}$ -Glycin mit aktiviertem N-Fluorenyl-Methoxycarbonyl-Succinimid geschützt, gereinigt und an das am Harz befindliche, in den Seitenketten geschützte Peptid mittels Dicyclohexyl-carbodiimid kovalent N-terminal gekoppelt. Anschließend wurde das Peptid vom Harz abgespalten, mittels HPLC gereinigt und im perfundierten Gefäßmodell sowie in der Zellkultur auf Bindung an die Zielzellen hin untersucht.

25

## 8. Versuchsprotokoll zur Synthese des radioaktiv markierten $^{14}\text{C}$ -Fmoc-Glycins

30

20  $\mu\text{mol}$  des sich in 5 ml Wasser befindenden, radioaktiv markierten  $^{14}\text{C}$ -Glycins (entsprechend 1 mCi; DuPont) wurden zusammen mit 38 mg Glycin (0,5 mmol) und 53 mg  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (0,5 mmol) in einem 25 ml Rundkolben vorgelegt und tropfenweise unter Rühren mit 165 mg (0,49 mmol) in 5 ml Aceton gelöstem N-Fluorenylmethoxycarbonyl-Carbonat

35



(Fmoc-Carbonat) versetzt. Während des Zutropfens (60 min) wurde der pH-Wert durch Zugabe von 1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  konstant gehalten. Anschließend wurde das Gemisch über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen, die wäßrige Phase durch Zugabe von 2 M HCl angesäuert und zweimal mit je 10 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Ethylacetatphasen wurden mehrmals mit Wasser neutral gewaschen, mit  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Produkt durch Zugabe von Petrolether gefällt und abfiltriert. Zur Reinigung wurde das Produkt in Ethylacetat gelöst und durch Zugabe kleiner Mengen Petrolether langsam ausgefällt.

10 Ausbeute: 95 mg (entsprechend 68 % der Theorie)  
0,32 mmol  
spezifische Aktivität: 0,0064 MBq/ $\mu\text{mol}$

#### 15 9. Versuchsprotokoll zur Synthese radioaktiv markierter Peptide

Das markierte Fmoc-Glycin wurde für die Synthese von insgesamt 0,4 mmol Peptid eingesetzt, so daß jedes Peptid zu 75% markiert wurde.

20 Die entsprechende Menge des Harz/Peptid-Gemischs (0.1 mmol) wurde eingewogen und in eine Glasfritte mit Schliffstopfen und Hahn gegeben. 25 mg des  $^{14}\text{C}$ -Fmoc-Glycins (0,075 mmol) wurden in 1 ml NMP gelöst, mit 155  $\mu\text{l}$  0,45M HBTU/HOBt und 750  $\mu\text{l}$  2 M DIEA in NMP versetzt, zum Harz/Peptid-Gemisch gegeben und eine Stunde unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden zur Vervollständigung der Kopplung 150 mg Fmoc-Glycin (0,5 mmol) in 2 ml NMP gelöst, mit 2 ml 0,45M HBTU/HOBt und 1 ml 2M DIEA versetzt und zum Reaktionsgemisch zugegeben. Das Gemisch wurde 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert, das nicht reagierte Fmoc-Glycin abfiltriert und das Gemisch viermal mit je 6-10 ml NMP gewaschen. Die Abspaltung der Schutzgruppe erfolgte durch 30minütige Inkubation mit 22% Piperidin in NMP unter Rühren. Das Piperidin wurde abfiltriert, und das Harz/Peptid-Gemisch anschließend je viermal mit NMP und DCM gewaschen.

#### 35 10. Versuchsprotokoll zur Abspaltung der Schutzgruppen

Zur Abspaltung der Schutzgruppen wurde das Gemisch eiskühlt und mit einer Lösung aus 0,75 g Phenol, 0,25 ml EDT, 0,5 ml Thioanisol, 0,5 ml Wasser und 10 ml TFA unter Rühren versetzt. Anschließend wurde zwei Stunden bei Raumtemperatur unter Rühren  
 5 inkubiert, das frei gewordene Peptid abfiltriert und durch Zugabe des fünffachen Volumens eiskühlem Diethylether gefällt. Nach der Zentrifugation wurde das im Sediment befindliche Peptid mehrmals mit Diethylether gewaschen und erneut zentrifugiert.

Die Peptide wurden chromatographisch mittels eines Äkta-Purifiers 100 über eine RPC-  
 10 Resource-Säule (3 ml, Pharmacia) mit einem 20minütigem Gradienten von Wasser, 0,1 % TFA bis 95 % Acetonitril, 0,07 % TFA bei einer Fließgeschwindigkeit von 2 ml/min gereinigt und anschließend lyophilisiert.

Ausbeuten: 65,6 und 70,8 % (je nach Peptid)

15 spezifische Aktivität: 0,0165 bis 0,0182 MBq/ $\mu$ mol

## 11. Bindungsstudien

20 Für die Bindungsstudien im perfundierten Gefäßmodell sowie in der Zellkultur auf Bindung an die Zielzellen wurden die Gefäße bzw. die Zellen für verschiedene Zeitintervalle mit unterschiedlichen Konzentrationen der zu untersuchenden Peptide inkubiert und die Menge an gebundenen Peptid pro cm Gefäß bzw. pro Zellzahl bestimmt.

### 25 11.1 Bindung an die perfundierte Carotis

Aus Fig. 3 ist zu entnehmen, daß das Peptid 36 in der ex-vivo Perfusion annähernd vierfach stärker an die dilatierte Carotis bindet, als an die unbehandelte Kontrolle.

### 30 11.2 Bindung an Endothelzellen des Schweins in Zellkultur

Da das Peptid 36 auch Homologien zur porcinen  $\alpha_4$ -Intergrinsequenz aufweist, wurden

desweiteren Zellkulturuntersuchungen an porcinen Endothelzellen durchgeführt, die durch Behandlung mit Lipopolysacchariden (LPS) und dem Tumor-Nekrose Faktor ( $\text{TNF}\alpha$ ) stimuliert wurden. Diese Stimulation entspricht einer in-vivo Aktivierung von Zellen, die bei Streß oder inflammatorischen Reizen ausgesetzten Gefäßarealen und damit auch in restenotischen Gefäßarealen lokalisiert sind.

Die Bindungskonstanten des Peptids gegenüber aktivierten und nicht-aktivierten Endothelzellen unterscheiden sich dabei um fast 3 Zehnerpotenzen (Fig. 4). An Kontrollzellen (COS) bindet das Peptid praktisch nicht.

5

Patentansprüche

1. ~~Gewebebindendes Peptid ausgewählt aus einem Peptid mit der Aminosäuresequenz~~  
GEGRTVVLSF, AWCRRGILGDAM, GNLVDLVVGFDD, RVSPPKKSGGGV,  
10 GSSKWGLTXKCG, RGGVRQRSRGRR, GEGRTVVCRS oder SQRWTALWQWIG  
sowie Varianten davon.

2. Nukleinsäure kodierend für ein gewebebindendes Peptid gemäß Anspruch 1.

15 3. Nukleinsäure nach Anspruch 2 ausgewählt aus einer Nukleinsäure mit der  
Nukleotidsequenz  
GGCGAGGGGCGAACAGTCGTATTGTCGTTCTG,  
GCCTGGTGTCTGGGGGGGTATCCTGGGCGACGCTATG,  
GGAAACCTGGTGGATCTAGTTGTGGGTTTTGACGAC,  
20 CGGGTGAGTCCGCCAAAGAAGTCGGGGGGCGGCGTG,  
GGGAGTAGCAAGTGGGGATTGACTTAAAAATGTGGG,  
CGCGGGGGAGTCCGCCAAAGAAGTCGGGGGGCGGCGT,  
GGCGAGGGGCGAACAGTCGTATGTCGTTCTG oder  
TCCCAGAGGTGGACTGCACTCTGGCAATGGATCGGG  
sowie Varianten davon.

4. Vektor enthaltend eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 2 oder 3.

5. Verfahren zur Herstellung eines gewebebindenden Peptids gemäß Anspruch 1,  
30 dadurch gekennzeichnet, daß das Peptid entweder chemisch synthetisiert oder  
gentechnisch hergestellt wird.

6. Verfahren zum Auffinden eines gewebebindenden Peptids enthaltend folgende  
Schritte:

35 (a) In-Kontakt-bringen eines Gewebes mit einem oder mehreren Peptiden, und

(b) Isolieren eines oder mehrerer gewebebindender Peptide.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die gemäß Schritt (b) isolierten Peptide wiederholt ein oder mehrmals mit demselben oder mit einem anderen Gewebe in Kontakt gebracht werden.

8. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Gewebe ein krankhaftes Gewebe ist.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 6-8, dadurch gekennzeichnet, daß das oder die Peptide in einer Peptidbank enthalten sind.

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Peptidbank eine peptidpräsentierende Bank, vorzugsweise eine peptidpräsentierende Bakterienbank ist.

11. Verwendung eines gewebebindenden Peptids gemäß Anspruch 1 oder erhalten nach dem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 6-10 für den gewebespezifischen Transfer von Substanzen, insbesondere von pharmazeutisch aktiven Verbindungen, vor allem für den gewebespezifischen Gentransfer.

12. Verwendung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß der Gentransfer viral und/oder nicht-viral, vorzugsweise mit Hilfe von Liposomen abläuft.

13. Verwendung nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß ein oder mehrere gewebebindende Peptide über eine positiv geladene Domäne an eine oder mehrere Nukleinsäuren gebunden sind.

14. Verwendung eines gewebebindenden Peptids gemäß Anspruch 1 oder erhalten nach dem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 6-10 zur Änderung des Tropismus von Viren, insbesondere von Adenoviren.

15. Verwendung eines gewebebindenden Peptids gemäß Anspruch 1 oder erhalten nach dem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 6-10 zur Diagnose von krankhaft



verändertem Gewebe und/oder zur Darstellung verschiedener Abschnitte des Gefäßsystems, vorzugsweise kleine/große Gefäße, Venen oder organspezifisches Endothel.

- 5 16. Verwendung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß das krankhaft veränderte Gewebe ausgewählt ist aus einem pathologisch verändertem Gefäß; bei Entzündungen; Arteriosklerose; Gefäßen, die Tumorgewebe versorgen; Gewebe mit proliferierenden glatten Muskelzellen des Gefäßsystems.
- 
- 10 17. Verwendung nach Anspruch 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, daß das gewebebindende Peptid markiert, vorzugsweise radioaktiv markiert ist.
- 15 18. Arzneimittel und/oder Diagnostikum enthaltend ein oder mehrere gewebebindende Peptide gemäß Anspruch 1, eine oder mehrere Nukleinsäuren gemäß einem der Ansprüche 2-4 oder ein oder mehrere gewebebindende Peptide erhalten nach dem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 6-10, und gegebenenfalls geeignete Hilfs- und/oder Zusatzstoffe.
- 20 19. Zusammensetzung enthaltend ein oder mehrere gewebebindende Peptide gemäß Anspruch 1, ein oder mehrere Nukleinsäuren gemäß einem der Ansprüche 2-4 oder ein oder mehrere gewebebindende Peptide erhalten nach dem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 6-10, und eine weitere Substanz, vorzugsweise eine pharmazeutisch aktive Verbindung, und gegebenenfalls geeignete Hilfs- und/oder Zusatzstoffe.

Prof. Dr. Jürgen Schrader

2. Oktober 1998  
C 27609 DO/BÖ

5 Zusammenfassung

~~Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf gewebebindende Peptide mit der Aminosäuresequenz~~

GEGRTVVLSF, AWCRRGILGDAM, GNLVDLVVGFDD, RVSPPKKSGGGV,

- 10 GSSKWGLTXKCG, RGGVRQSRGRR, GEGRTVVCRS oder SQRWTALWQWIG sowie Varianten davon, ihre Identifizierung mit Hilfe von Geweben, ihre Herstellung und Verwendung als Arzneimittel oder Diagnostikum.

M 18.12.99

1

Fig. 1

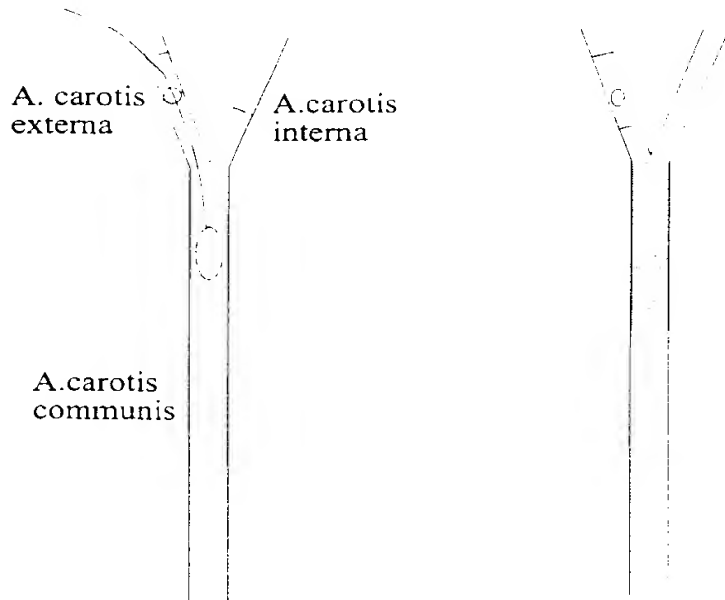




Fig. 2

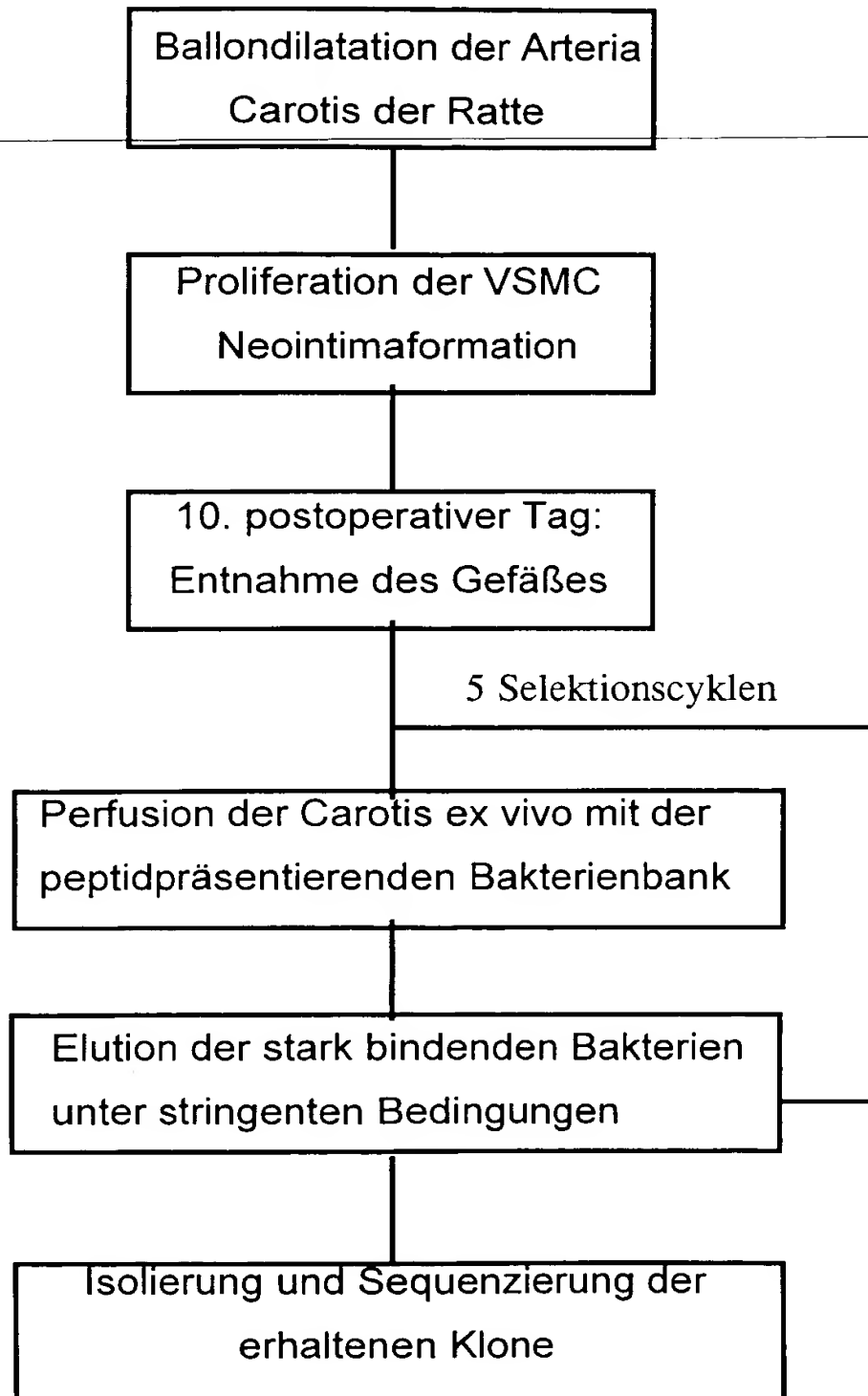


Fig. 3

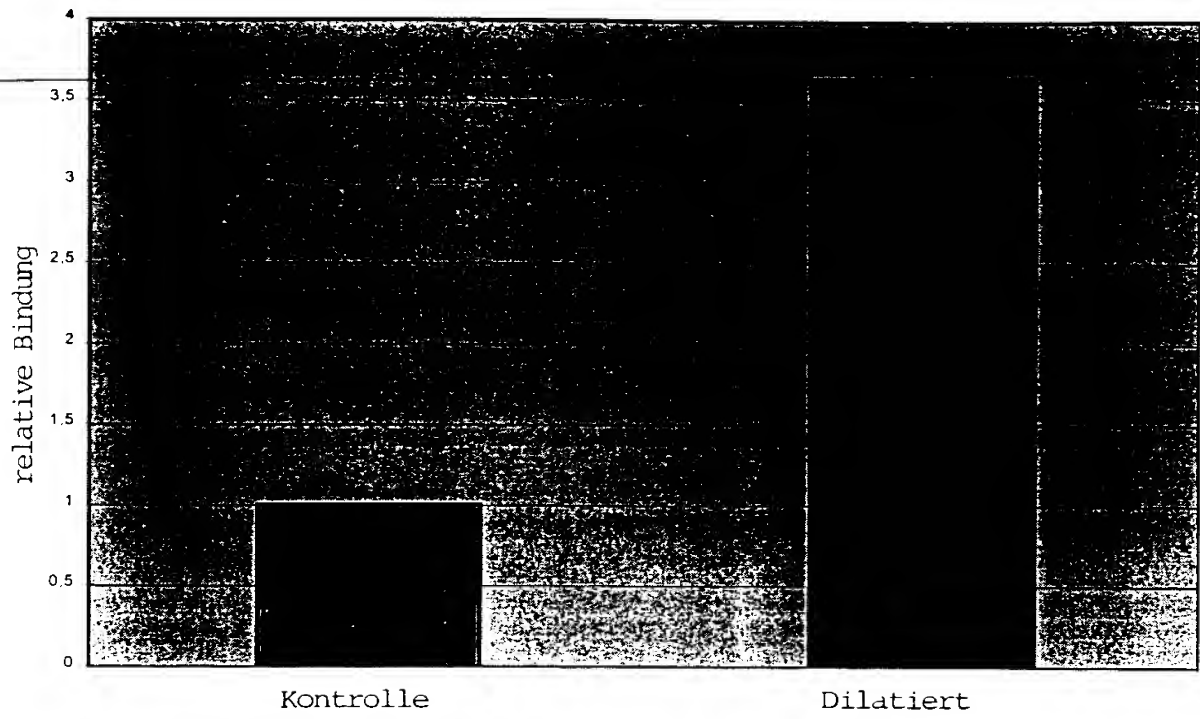
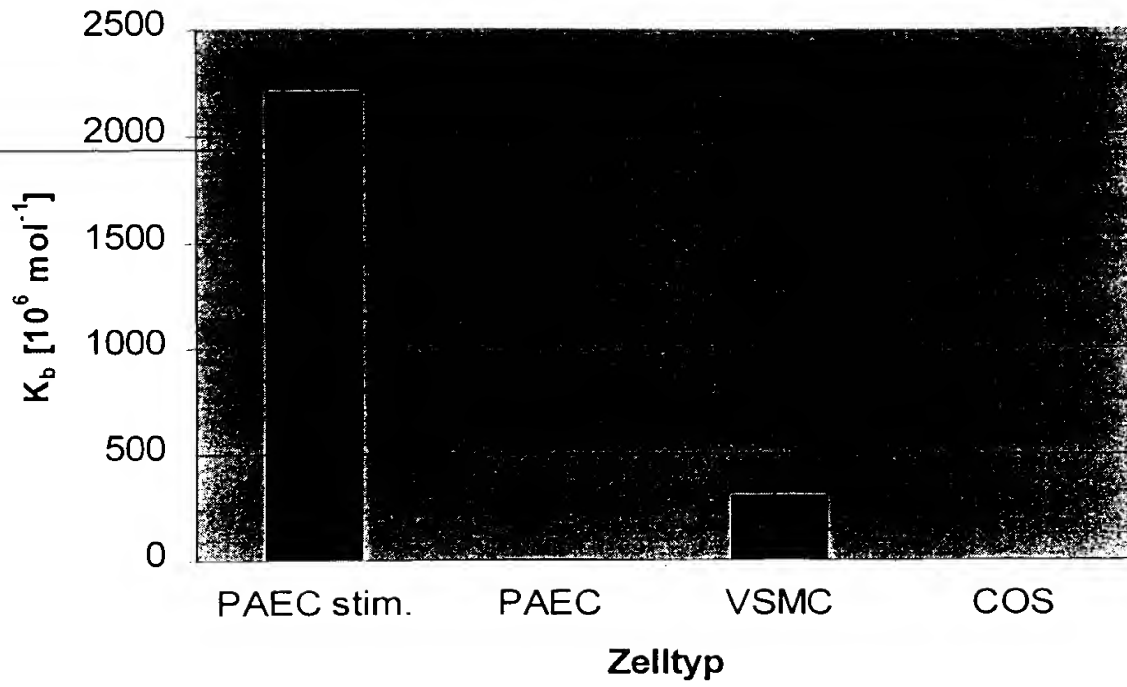


FIG. 4



H 10.12.99

Tab. 1

Klon	DNA-Sequenz	AS-Sequenz
3	GGCGAGGGGCGAACAGTCGTATTGTCGTTTCG	GEGRTVVLSF
4, 13	GCCTGGTGTCGGGGGGGTATCCTGGGCGACGCTATG	AWCRGGILGDAM
7, 23	GGAAACCTGGTGGATCTAGTTGTGGGTTTTGACGAC	GNLVDLVVGFDD
9	CGGGTGAGTCCGCCAAAGAAGTCGGGGGGCGGCGTG	RVSPPKKSGGGV
17, 20, 21, 22, 29, 30	GGGAGTAGCAAGTGGGGATTGACTTAAAAATGTGGG	GSSKWGLTXKCG
19	CGCGGGGGAGTCCGCCAAAGAAGTCGGGGGGCGGCGT	RGGVRQRRSRRR
32	GGCGAGGGGCGAACAGTCGTATGTCGTTTCG	GEGRTVVCRS
36	TCCCAGAGGTGGACTGCACTCTGGCAATGGATCGGG	SQRWTALWQWIG

15.12.99  
1

C27609

## SEQUENZPROTOKOLL

### (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

#### (i) ANMELDER:

- (A) NAME: Prof. Dr. Jürgen Schrader
- (B) STRASSE: Meliesallee 13
- (C) ORT: 40597 Düsseldorf
- (D) BUNDESLAND:
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 40597

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Gewebebindende Peptide, ihre Identifizierung, Herstellung und Verwendung

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 17

#### (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: WINDOWS NT
- (D) SOFTWARE: WORD97

### (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1

#### (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 10
- (B) ART: Aminosäuresequenz
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1

GEGRTVVLSF

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 12
  - (B) ART: Aminosäuresequenz
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2

AWCRGGILGD AM

12

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 12
  - (B) ART: Aminosäuresequenz
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3

GNLVDLVVGF DD

12

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 12
  - (B) ART: Aminosäuresequenz
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus



(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4

RVSPPKKSGG GV

12

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 12

(B) ART: Aminosäuresequenz

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5

GSSKWGLTXK CG

12

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 12

(B) ART: Aminosäuresequenz

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6

RGGVRQRSRG RR

12

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 10

(B) ART: Aminosäuresequenz

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
- (v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7

GEGRTVVCRS

10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 12
  - (B) ART: Aminosäuresequenz
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
- (v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8

SQRWTALWQW IG

12

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 23
  - (B) ART: Aminosäuresequenz
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
- (iv) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9

GLFHAIAHFI HGGWHGLIHG WYG

23



(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 31
  - (B) ART: Nucleotidsequenz
  - (C) STRANGFORM: Doppelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nukleinsäure: kodierende DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10

GGCGAGGGGC GAACAGTCGT ATTGTCGTTC G

31

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 36
  - (B) ART: Nucleotidsequenz
  - (C) STRANGFORM: Doppelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nukleinsäure: kodierende DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11

GCCTGGTGTC GGGGGGGTAT CCTGGGCGAC GCTATG

36

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 36
  - (B) ART: Nucleotidsequenz
  - (C) STRANGFORM: Doppelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nukleinsäure: kodierende DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12

GGAAACCTGG TGGATCTAGT TGTGGGTTTT GACGAC

36

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 36
- (B) ART: Nucleotidsequenz
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nukleinsäure: kodierende DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13

CGGGTGAGTC CGCCAAAGAA GTCGGGGGGG GGCCTG

36

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 36
- (B) ART: Nucleotidsequenz
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nukleinsäure: kodierende DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14

GGGAGTAGCA AGTGGGGATT GACTTAAAAA TGTGGG

36

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 36
- (B) ART: Nucleotidsequenz
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nukleinsäure: kodierende DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15

CGCGGGGGAG TCCGCCAAAG AAGTCGGGGG CGGCGT

36

14.10.99  
7

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 30
  - (B) ART: Nucleotidsequenz
  - (C) STRANGFORM: Doppelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nukleinsäure: kodierende DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16

GGCGAGGGGC GAACAGTCGT ATGTCGTTCC

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 36
  - (B) ART: Nucleotidsequenz
  - (C) STRANGFORM: Doppelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nukleinsäure: kodierende DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17

TCCCAGAGGT GGACTGCACT CTGGCAATGG ATCGGG

36



...